

10/509622
PCT/JP 03/07148
29 SEP 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月 7日

出願番号
Application Number: 特願2003-060749
[ST. 10/C]: [JP 2003-060749]

出願人
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

REC'D 25 JUL 2003

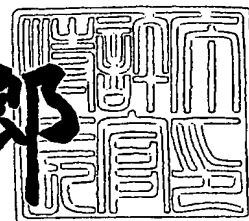
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3055139

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003246

【提出日】 平成15年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 川上 政勝

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089200

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長井 省三

 【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109357

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 恵美子

 【電話番号】 03-5916-5111

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005348

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規オキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または、請求項 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項 6】 (1) 被験者における、請求項 3 に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法。

【請求項 7】 請求項 3 で表されるオキシダーゼ遺伝子の特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キット。

【請求項 8】 (1) 請求項 1 又は請求項 2 に記載のポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、(2) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び(3) 前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 9】 請求項 1 又は請求項 2 に記載のポリペプチドの活性を抑制する物質が関節リウマチ治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質である、請求項 8 記載のスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、新規なオキシダーゼであるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞、関節リウマチ（RAと略す）診断に有用な検査方法及びRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリッ酸（NADPH）オキシダーゼはNADPHから電子を受け取り、それを最終的に酸素分子に渡して活性酸素種（ROSと略す）を生成する酵素である。生理的には主に食細胞に存在する前記酵素は微生物等の異物の侵入に対し、ROSを生成し殺菌するような生体防御に重要な働きをしている。しかし、この酵素によるROSの過剰な生成はタンパク質、DNAの切断や過酸化脂質による膜の損傷などを引き起こし、細胞および組織の障害、ひいては炎症性疾患、血管病、神経変性疾患、癌、心疾患などをはじめとする様々な疾患の原因となることが知られている（非特許文献1参照）（非特許文献2参照）。しかしながら、ROSを生成するNADPHオキシダーゼはその発現が全身性に分布するため、創薬の標的としては副作用が懸念されていた。

一方、最近の研究により非食細胞に存在するNADPHオキシダーゼファミリー、NOX1が同定され、食細胞以外にもROSが組織特異的に生成されていることが報告された（非特許文献3参照）。NOX1は大腸に多量に存在し、細胞増殖や様々な遺伝子発現誘導を引き起こすことが報告され、大腸における様々な疾患に関わることが示唆されている。

RAは滑膜組織に病変の主座を持ち、関節の発赤、腫脹、熱感、疼痛、運動制限、および破壊をもたらす原因不明の慢性炎症性疾患である。RAの滑膜組織では、インターロイキン-1（interleukin-1、IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン

-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α 、TNF- α)などの炎症性サイトカイン、一酸化窒素 (nitric oxide、NO)、プロスタグランジン (prostaglandins、PGs)などの過剰産生が知られている (非特許文献4参照)。近年、モノクローナル抗体、可溶性受容体などを用い、IL-1、IL-6やTNF- α を標的とした治療法が開発されその有効性が注目を集めている (非特許文献5参照)。しかし、従来の治療標的分子を機序とする治療法では完全寛解導入には至らない患者群が存在する (非特許文献6参照)。従って、既存の報告とは異なる新しい治療標的分子の同定が望まれている。

ROSは酸化還元制御を介して (非特許文献7参照)、様々な分子を発現誘導する転写因子であるNF κ Bを活性化することが知られている。NF κ Bにより発現誘導を受ける分子のうち炎症性サイトカインとして知られるTNF α は抗RA薬の標的として (非特許文献8参照)、プロスタグランジンの合成酵素として知られるCOX-2はRAや変形性関節炎の治療薬の標的として広く臨床においても認知されている (非特許文献9参照)。

一方、米国の大学からRAの分類に関する基準が定義されているが (非特許文献10参照)、これらの基準は単なるランドマークであり、その病状パターンが多様であるため、RAの診断、特に定量的かつ簡便な診断は困難であるとされてきた。

【0003】

【非特許文献1】

「トレンド・イン・ファーマコロジカル・サイエンス (Trends In Pharmacological Science)」, (米国), 2000年, 第21巻, p. 119-120

【非特許文献2】

「フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサエティー (Federation of European Biochemical Society)」, (独国), 1991年, 第281巻, p. 9-19

【非特許文献3】

「ネイチャー (Nature)」, (英国), 1999年, 第401巻, p. 79-82

【非特許文献4】

「ザ・ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (The Journal of Experimental Medicine)」, (米国), 1991年, 第173巻, p. 569-574

【非特許文献5】

「カレント・ファーマシューティカル・バイオテクノロジー (Current Pharmaceutical Biotechnology)」, (米国), 2000年, 第1巻, p. 217-233

【非特許文献6】

「ネイチャー・レビューズ・イムノロジー (Nature Reviews Immunology)」, (英国), 2002年, 第2巻, p. 364-371

【非特許文献7】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1993年, 第268巻, p. 11380-11388

【非特許文献8】

「アースライティス・アンド・リウマティズム (Arthritis & Rheumatism)」, (米国), 1999年, 第36巻, p. 1681-1690

【非特許文献9】

「アースライティス・アンド・リウマティズム (Arthritis & Rheumatism)」, (米国), 1998年, 第41巻, p. 1591-1602

【非特許文献10】

ジェー・アックスフォード (J. Axford) 編, 「メディシン (Medicine)」, (米国), ブラックウエルサイエンス (Blackwell Science), 1996年, p3. 18-3. 22

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、疾患の原因となるROSを生成する酵素であり、その疾患の診断に有用な新規なオキシダーゼを提供することを課題とする。また、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0005】**【課題を解決するための手段】**

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒトRA患者由来滑膜細胞から新規なオキシダーゼ遺伝子全長配列を決定することに成功した（NOX1-bと称する）。さらに、該オキシダーゼ遺伝子は、健常人由来滑膜細胞には発現しておらず、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現していることを見出し、該オキシダーゼ特異的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーを用いることによりRA診断法として有用な検査方法を可能にした。加えて、前記新規オキシダーゼ遺伝子を利用することによりRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法を構築し提供した。

【0006】

すなわち本発明は、

- [1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、
- [2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- [3] 請求項1または、請求項2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- [4] 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、
- [5] 請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された細胞、
- [6] (1) 被験者における、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する

工程

を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法、

〔7〕請求項3で表されるオキシダーゼ遺伝子を特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キット、

〔8〕〔1〕又は〔2〕に記載のポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、

前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び

前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程

を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法、

〔9〕〔1〕又は〔2〕に記載のポリペプチドの活性を抑制する物質が関節リウマチ治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質である、〔8〕記載のスクリーニングする方法

に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本明細書において、「RA」は「関節リウマチ」の略語として用いる。従来RAの日本語訳は「慢性関節リウマチ」であったが、2002年の日本リウマチ学会においてRAの日本語訳を「慢性関節リウマチ」から「関節リウマチ」と変更するとの発表がなされているので、本明細書ではそれに従った。

本発明のポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド；（以下、機能的等価改変体と称する）；及び
- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド（以下、相同ポリ

ペプチドと称する) ;

が含まれる。

【0008】

「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1~10個、好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましい。

「本発明の相同ポリペプチド」は、「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上であるアミノ酸配列を含むポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST(Basic local alignment search tool; Altschul, S.F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 検索により得られた値を意味する。なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、

「Gap挿入Cost値」を「0」で、

「Gap伸長Cost値」を「0」で、

「Matrix」として「BLOSUM62」を、

それぞれ使用する。

本発明の機能的等価改変体および相同ポリペプチドの起源はヒトに限定されない。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列のヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物(例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)由来の機能的等価改変体または相同ポリペプチドが含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド(すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来の機能的等価改変体または相同ポリペプチド)又は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を元にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれ

る。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0009】

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチド、本発明の機能的等価改変体、及び本発明の相同ポリペプチドを総称して、以下、「本発明のポリペプチド」と称する。「本発明のポリペプチド」のうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「NOX1-b蛋白質」と称する。

本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上（好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上）であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」がより好ましい。

【0010】

また、本発明のNOX1-b蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号2記載のアミノ酸配列で示されるNOX1-b蛋白質、その機能的等価改変体、あるいは、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1記載の塩基配列である。

【0011】

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわちcDNA

ライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法)を用いる方法、又は(3)化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、新規酵素の発明を開示したW001/34785の記載と同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明のポリペプチド(例えばNOX-1b蛋白質)、「本発明の遺伝子」を本発明のポリヌクレオチド(例えばNOX1-b)と読み替える。詳細には、

PCRを用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法a)第1製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば、ヒトRA患者由来滑膜からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAをランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖cDNAを合成することが出来る。得られた第一鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば配列番号5及び配列番号6で表される配列をプライマーとして、実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法b)第2製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法c)第3製造法、d)第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2)本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造法に記載された方法により実施できる。より具体的には、本発明の発現ベクターはほ乳類動物細胞の発現ベクターpcDNA3.1/HisBを用い実施例2に記載の方法で、本発明の宿主細胞及び蛋白質はNIH3T3細胞をトランスフェクション試薬で形質転換する実施例3に記載の方法で製造できる。

本発明のポリヌクレオチドは、それ自体後述のRAの検査方法においてハイブリダイズプローブとして用いることができ、RAの検査に有用である。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体の作製や、発現レベルを検出・定量する際のコントロールとして用いることができる。

【0012】

＜RAの検査方法／RA検査用キット＞

後述のように、健常者由来のサンプルにはNOX1-bが発現しておらず、RA患者由来のサンプルに特異的にNOX1-bが発現していることを見出したことから、この発現を利用してRA疾患を検出することが出来る。具体的には、次の工程を含む態様が例示される。すなわち、

(1) 被験者における、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程、である。

本発明のRAの検査方法における遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。従って、本発明によるRAの検査方法は、NOX1-b遺伝子に対応するmRNAの発現レベル、または、該遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

工程(1)における請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子(NOX1-b遺伝子)の発現レベルを測定する方法は公知の遺伝子解析法に従って実施することが出来る。例えば、NOX1-b遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または、NOX1-b遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することが出来る。具体的には、被験者から得た滑膜細胞由来の核酸、例えばmRNA等を用いて測定することが出来る。mRNA量の測定は、NOX1-b配列を特異的に増幅できるように設計したプライマーを用いて遺伝子増幅反応方法にて測定できる。遺伝子増幅反応方法としては、特に限定されないが、PCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法などを利用することが出来る。より具体的には、実施例4に記載の方法により実施できる。本発明のRAの検査方法に用いられるプライマー、または、RA検査用キットに含まれるプライマーは、NOX1-b配列を特異的に増幅できるものであれば、特には限定され

ず、NOX1-b塩基配列に基づいて設計できる。好ましくは、配列番号5及び配列番号6に記載されたオリゴヌクレオチドである。

ハイブリダイゼーション技術を利用したRAの検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロット法、DNAマイクロアレイ法などを使用して行うことが出来る。さらには、RT-PCR等の遺伝子増幅技術を利用することにより実施できる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター（リアルタイムPCR）法を用いることにより、NOX1-b遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。PCR増幅モニター法としては、例えば、ABI PRISM7700（アプライドバイオシステムズ社）を用いることが出来る。

また、工程（1）において、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する方法として、発現レベルを本発明のポリペプチドからなる蛋白質、好ましくは、NOX1-b蛋白質の検出によって測定する方法が可能である。このような検査方法としては、例えば、被験者から得た滑膜細胞由来の細胞抽出液を用いて、本発明のポリペプチドからなる蛋白質、好ましくはNOX1-b蛋白質に結合する抗体、より好ましくはNOX1-bに特異的に結合する抗体を利用したウエスタンブロッティング、免疫沈降法、ELISA法などを利用することが出来る。

工程（2）においては、工程（1）で得られた発現レベルと健常者における発現レベルと比較するのであれば、比較方法は特に限定されず、例えば実施例4に記載の方法で比較できる。

本発明のRA検査用キットには、少なくとも、本発明のポリペプチドを特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーが含まれる。順方向及び逆方向プライマー対の例としては、配列番号5及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるプライマーが挙げられる。本発明のRA検査用キットに含めることが出来る他の試薬としては、PCRを行うのに必要な試薬（例えば、Taqポリメラーゼ、ヌクレオチド基質、緩衝液など）などを挙げることができる。

【0013】

<本発明のスクリーニングする方法>

本発明のスクリーニングする方法には、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法と、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療

用物質をスクリーニングする方法とが含まれる。

【0014】

(1) 本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法

本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質のスクリーニング方法は、下記工程 (i) ~ (iii) を含む限り、特に限定されるものではない：

(i) 本発明のポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、

(ii) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び

(iii) 前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程。

好ましくは実施例5に記載の方法により本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

【0015】

(2) RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法

従来の技術の欄で述べたように炎症性サイトカインとして知られるTNF α は抗RA薬の標的として、プロスタグランジンの合成酵素として知られるCOX-2はRAや変形性関節炎の治療薬の標的として広く臨床においても認知されている。

従って、TNF α 又はCOX-2の発現量を減少させる物質を選択することにより、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングすることができる。後述の実施例に示す様に、本発明のポリペプチドの一つであるNOX1-bを発現する細胞においてCOX-2発現量及びTNF α 発現量が有意に亢進していることが明らかとなった（実施例6及び実施例7）。また、このCOX-2発現誘導及びTNF α 発現誘導がNOX1-bの阻害剤であるDPIにより阻害されたことから、本発明のポリペプチドの一つであるNOX1-b由来のROSによる酸化還元制御を介してCOX-2及びTNF α が発現誘導されていると考えられた。本発明のポリペプチドの活性を抑制することによりCOX-2発現及び／又はTNF α の発現誘導が抑制されるという本発明者らが見出した新規な知見から、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質は、RA治療効果を有すると考えられた。即ち、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法は、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法として利用できる。

本発明のRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法は、下記工程 (i) ~ (iii) を含む限り、特に限定されるものではない：

- (i) 本発明のポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、
- (ii) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び
- (iii) 前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程。

上記スクリーニング方法で得られた物質を、RA治療剤に関する公知の評価系あるいは、それを改良した評価系にかけることにより、RA治療用物質として有用な物質であるか否かを判定することができる。例えば、RA治療作用の確認は、コラーゲン誘発関節炎モデルマウス (Fiona H. Durisら, Clin. Immunol. Immunopathol., 73, 11-18, 1994) を用いる方法により行なうことができる。また、上記スクリーニング方法で得られた物質を、変形性関節炎治療剤に関する公知の評価系にかけることにより、変形性関節炎治療用物質として有用な物質であるか否かを判定することができる。

【0016】

本発明のスクリーニングする方法として、本発明のポリペプチドの活性を分析 (測定又は検出) するために用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- (a) 化学-生化学的方法
- (b) 化学発光法
- (c) 電子スピン共鳴分光 (ESR) 法

などを挙げることができる。各スクリーニング方法について以下に説明する。

【0017】

- (a) 化学-生化学的方法

本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質は、化学-生化学的方法を利用してスクリーニングすることができる。化学-生化学的方法としては、例えば (i) のシトクロムC還元法を利用したスクリーニング方法、(ii) ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の還元を利用したスクリーニング方法、(iii) 水溶性テトラゾリウム塩の還元を利用したスクリーニング方法を挙げることができる。シトクロムC還元法による検出

は酸化型シトクロムCが還元されると550 nmに強い吸収をもつ還元型に変わることを利用したものである (J.M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049(1969))。NBT還元法はNBTが O_2^- により還元され水不溶性のブルーホルマザン(吸収極大560nm)を生じることを利用したものである (C. Beauchamp and I. Fridovich, Anal. Biochem., 44, 276 (1971))。

本発明のポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にプローブ (例えばシトクロムC) を適量添加して一定時間インキュベーションする。反応後、550nmの吸光度を測定する。試験物質を添加した場合に、還元型への転換が抑制されれば、前記試験物質は、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質であると判定することができる。本方法のうちの一つであるシトクロムC還元法を利用したスクリーニング方法は、実施例5に記載の条件で実施することが好ましい。本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質としては、 $10\mu M$ 以下、好ましくは $1\mu M$ 以下、更に好ましくは $0.1\mu M$ 以下のものを選択することが好ましい。

(b) 化学発光法

化学発光法としては、例えば (i) ウミホタルルシフェリン誘導体を利用したスクリーニング法、(ii) ルミノール法を利用したスクリーニング法を挙げることができる。ウミホタルルシフェリン誘導体は中性付近の水溶液で O_2^- と反応して励起カルボニル体を生じ、それが基底状態に遷移する過程で380nmに強く発光することを利用したものである (Goto, T: Pure Appl Chem, Vol7, 421-441, 1968)。ルミノール法による検出はアルカリ水溶液で、 O_2^- または H_2O_2 の存在下で $HOCl$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $K_2S_2O_8$ 、 Fe^{2+} 塩、 Co^{3+} などにより酸化されてアミノフタル酸ジアニオン (励起状態) を生じ、それが基底状態に遷移する過程で発光することを利用したものである (Roswell, D.F. et al: Method in Enzymology, Vol15, 409-423, 1972)。

本発明のポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にプローブ (例えばウミホタルルシフェリン誘導体) を適量添加して一定時間作用させる。反応後、380nmの発光を測定する。試験物質を添加した場合に、発光が抑制されれば、前記試験物質は、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質であ

ると判定することができる。本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質としては、 $10\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $1\mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは $0.1\mu\text{M}$ 以下のものを選択することが好ましい。

(c) 電子スピン共鳴分光(ESR)法

O_2^- のESRシグナルは、スピントラップ法を用いることで間接的に測定することができる。つまりESR法は短い寿命のラジカル種をトラップ剤と反応させ、生成する安定なラジカルとし、そのESRスペクトルを解析することを利用したものである。現在用いられている最も汎用性の高いスピントラップ剤は5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO)である (Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, 35 (1997))。本発明のポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にスピントラップ剤 (例えばDMPO) を適量添加して一定時間作用させる。反応後、ラジカル付加体のスペクトル解析をする。試験物質を添加した場合に、ラジカル付加体のシグナルが抑制されれば、前記試験物質は、本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質であると判定することができる。本発明のポリペプチドの活性を抑制する物質としては、 $10\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $1\mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは $0.1\mu\text{M}$ 以下のものを選択することが好ましい。

【0018】

本発明のスクリーニング方法によって選択対象とする試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物 (ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. ら, *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995) によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. ら, *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物、植物、海洋生物、又は動物由来の天然成分 (例えば、培養上清又は組織抽出物) などもスクリーニングの試験物質として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物 (ペプチドを含む) を、化学的又は生物学的に修飾した化合物 (ペプチドを含む) を用いることができる。

【0019】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)等の遺伝子操作実験マニュアルや試薬等に添付のマニュアルに従った。

【0020】

(実施例1) 新規オキシダーゼNOX1-bの取得と全長オープンリーディングフレーム(open reading frame、ORF)配列の決定

キアゲン社のRNA抽出キット(RNAeasy Protect Mini Kit)を用いて東洋紡績社のRA患者由来滑膜細胞(HS-RA)よりmRNAを精製し、スーパースクリプトII(SUPERSCRIPT First-Strand Synthesis System for RT-PCR)(Gibco-BRL社)を用いcDNAに転換することにより作製した自家製のcDNAを鋳型とした。配列番号3と配列番号4で表されるNOX1のORFの外側をコードするオリゴDNAを合成し、DNAポリメラーゼ(PLATINUM™ Taq DNA polymerase; インビトロジェン社)を用いて、94℃1分の後、94℃30秒、55℃30秒、68℃3分のサイクルを35回のPCR反応を行った。この反応により得られたcDNAをクローニングベクター(TAクローニングキット; インビトロジェン社)に挿入(NOX1ベクター)し、ジデオキシターミネーター法によりABI3700 DNA シークエンサー(アプライドバイオシステムズ社)で解析し、ORF配列を決定した。この遺伝子をNOX1-bと名付けた。該遺伝子の全長塩基配列を配列番号1に、推定アミノ酸配列を配列番号2に示した。NOX1-bのORF配列はNOX1(Genbankアクセッション番号: AF127763)の第433番目から第481番目までがスプライシングアウトされた新規蛋白質をコードしていた。

【0021】

(実施例2) NOX1-b全長ORFのクローニングと蛋白質発現プラスミドの構築

実施例1で作製したNOX1-bベクターをEcoRI、XhoIで切断し、蛋白質発現ベクター(pcDNA3.1/HisB; インビトロジェン社)のEcoRI、XhoI部位に挿入して、全長蛋白質発現プラスミドpcDNA3.1/HisB・NOX1-bを完成した。

【0022】

(実施例3) HisB・NOX1-bの動物細胞株での発現

10cmプレートにNIH3T3細胞(大日本製薬社)を 1×10^6 細胞でプレーティングして12時間培養後、実施例2において作製した発現プラスミドpcDNA3.1/HisB・NOX1-b及び空ベクターpcDNA3.1/HisBを、トランスフェクション試薬(FuGENETM6 Transfection Reagent; ロシュ社製)を用いて添付指示書に従い、NIH3T3細胞に導入した。プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに48-60時間培養を継続した。導入細胞をPBSで洗浄後、SDSサンプルバッファー(S.B)で回収した。S.B中に目的蛋白質が存在することをNOX1蛋白質とNOX1-b蛋白質共通のC末端配列をエピトープとして認識する抗体(ウサギ抗MOX抗体; サンタクルズ社製)を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、回収した上記S.BをSDS/4%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)に電気泳動(還元条件)後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜(ミリポア社)に転写した。転写後のPVDF膜にブロックエース(大日本製薬社)を添加してブロッキングした後、ビオチン化ウサギ抗IgG抗体(M2; シグマ社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(アマシャムファルマシア社製)を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社)を用いて目的蛋白の発現を確認した。pcDNA3.1/HisB・NOX1-b導入細胞より得たサンプルには、分子量 52 ± 0.5 kDのバンドが検出されたが、空ベクター導入細胞より得たサンプルにはバンドは検出されず、pcDNA3.1/HisB・NOX1-b導入細胞でHisB・NOX1-bが発現していることがわかった。

【0023】

(実施例4) RA患者由来滑膜細胞におけるNOX1-b mRNAの発現上昇

実施例1で示したmRNA抽出法を用いて、大日本製薬社の健常人由来滑膜細胞(Cell System-SS cells)から自家製のcDNAを作製した。配列番号5と配列番号6で表されるNOX1-b特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、RA、健常人由来の各サンプル(各鋳型cDNAを1、1/10、1/100の希釈倍率で希釈したもの)に対してDNAポリメラーゼ(rTaq DNA polymerase; 東洋紡績社)を用いて、94℃1分の後、94℃10秒、55℃20秒、72℃30秒のサイクルを45回の半定量的RT-PC

R反応を行った。配列番号5で表されるプライマー配列は、NOX1がスプライシングアウトされた接続部位、すなわちNOX1蛋白質の第432番目と第482番目を接続した部位をコードするヌクレオチド配列であり、よってNOX1を認識しない配列である。従って、配列番号5と配列番号6によるPCR産物はNOX1-b特異的なものである。PCR反応物をアガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色によりDNAを検出したところ、NOX1-bと予想されるサイズのバンドがRA由来のサンプルでは認められたが、健常人のサンプルでは認めることができなかった。一方、コントロールである、配列番号7と配列番号8で表されるプライマーを用いたグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (G3PDH) のPCR反応においては、RA、健常人サンプル共に同様なEtBr染色によるバンドが認められた (図1)。これらのことより、健常人に対し、RA患者由来滑膜細胞において、NOX1-b発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、本実施例記載の方法でRA診断の検査が可能であることがわかった。

【0024】

(実施例5) NOX1-bのROS産生活性

実施例3で示したNOX1-b発現細胞を用いてシトクロムC還元法によりROS産生能を測定した。シトクロムC還元法によりROSを測定するために空ベクター発現細胞とNOX1-b発現細胞を96穴の細胞培養用マルチウェルプレート (マルチウェルプレートと略す) に 0.5×10^6 個/ $100 \mu\text{l}$ /穴の割合で撒いた。約12時間後に各条件下において 4.62 mg/ml のシトクロムCを $100 \mu\text{l}$ /穴加えて混合した後マルチウェルプレートをプレートリーダーにセットし、 550 nm の吸光度を経時的に測定した。1時間後の積算値を図2に示した。その結果NOX1-b発現細胞においては空ベクター発現細胞に比べ顕著なROS産生活性を有することが明らかになった。またこの活性は、NADPH Oxidase阻害剤として知られるDiphenylene Iodonium Chloride (DPIと略す) $1 \mu\text{M}$ をシトクロムC添加の30分前に加えることにより大きく抑制されることがわかった (図2)。これらのことによりNOX1-bはROS産生活性を有し、その活性はDPIにより阻害されることが明らかになった。

【0025】

(実施例6) NOX1-b発現細胞におけるCOX-2 mRNAの発現上昇

実施例 1 で示した mRNA 抽出法を用いて、空ベクター発現細胞及び NOX1-b 発現細胞から各々 cDNA を作製した。配列番号 9 と配列番号 10 で表される COX-2 特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、空ベクター発現細胞、NOX1-b 発現細胞由来の各サンプルに対して DNA ポリメラーゼ (rTaq DNA polymerase; 東洋紡績社) を用いて、94℃1 分の後、94℃10 秒、55℃20 秒、72℃30 秒のサイクルを 45 回の RT-PCR 反応を行った。PCR 反応物をアガロースゲルに電気泳動し、EtBr 染色により DNA を検出したところ、COX-2 と予想されるサイズのバンドが空ベクター由来のサンプルよりも NOX1-b 由来のサンプルで著しく上昇することが確認できた (図 3)。一方、コントロールである、配列番号 7 と配列番号 8 で表されるプライマーを用いた G3PDH の PCR 反応においては空ベクター発現細胞、NOX1-b 発現細胞由来のサンプル共に同様な EtBr 染色によるバンドが認められた (図 3)。したがって空ベクター発現細胞に対し、NOX1-b 発現細胞は COX-2 発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。

NOX1-b 阻害剤である DPI を終濃度 1 μ M となるように NOX1-b 発現細胞に添加し、3 時間後に mRNA 抽出法にて調製したサンプルを用いて上記と同様の RT-PCR を行ったところ、NOX-1b 発現による COX-2 発現誘導が DPI により阻害されることが明らかになった (図 3)。COX-2 発現誘導が DPI により阻害されたことから、NOX1-b 由来の ROS による酸化還元制御を介して COX-2 が発現誘導されたと考えられた。

【0026】

(実施例 7) NOX1-b 発現細胞における TNF α mRNA の発現上昇

配列番号 11 と配列番号 12 で表される TNF α 特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、実施例 6 で調製した各 cDNA サンプルに対して DNA ポリメラーゼ (rTaq DNA polymerase; 東洋紡績社) を用いて、94℃1 分の後、94℃10 秒、55℃20 秒、72℃30 秒のサイクルを 45 回の RT-PCR 反応を行った。PCR 反応物をアガロースゲルに電気泳動し、EtBr 染色により DNA を検出したところ、TNF α と予想されるサイズのバンドが NOX1-b 発現細胞由来のサンプルでは確認できたが、空ベクター発現細胞由来のサンプルにおいては認めることができなかった。一方、コントロールである、配列番号 7 と配列番号 8 で表されるプライマーを用いた G3PDH の PCR 反応においては空ベクター発現細胞、NOX1-b 発現細胞由来のサンプル共に

同様なEtBr染色によるバンドが認められた。さらに、NOX1-b由来細胞に対しNOX1-b阻害剤であるDPIを1 μ M、3時間前処理するとTNF α 発現誘導が阻害されることが明らかになった(図4)。したがって空ベクター発現細胞に対し、NOX1-b発現細胞はTNF α 発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、このTNF α 発現誘導はDPIにより阻害されることから、NOX1-b由来のROSによる酸化還元制御を介して行われていることが考えられる。

【0027】

【発明の効果】

本発明のポリヌクレオチドは、その発現亢進が病態と結びついていることから、RA診断の指標となることが解かった。本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドによってコードされる本発明のポリペプチドの発現を指標にすることによりRA診断の検査を行うことが可能となった。また、本発明は、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現する新規オキシダーゼを提供するものであり、その特異的なプライマー配列を用いたPCRによりRA診断の検査へ応用できることが期待される。本発明のスクリーニング方法は、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニングに有用である。

【0028】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd

<120> Novel oxidase

<130> 3246NXI

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1548

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1548)

<223> Inventor: Kawakami, Masakatsu

<400> 1

atg gga aac tgg gtg gtt aac cac tgg ttt tca gtt ttg ttt ctg gtt 48

Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val

1

5

10

15

gtt tgg tta ggg ctg aat gtt ttc ctg ttt gtg gat gcc ttc ctg aaa 96

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys

20

25

30

tat gag aag gcc gac aaa tac tac tac aca aga aaa atc ctt ggg tca 144

Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser

35

40

45

aca ttg gcc tgt gcc cga gcg tct gct ctc tgc ttg aat ttt aac agc 192

Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser

50

55

60

acg ctg atc ctg ctt cct gtg tgt cgc aat ctg ctg tcc ttc ctg agg 240
Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg
65 70 75 80

ggc acc tgc tca ttt tgc agc cgc aca ctg aga aag caa ttg gat cac 288
Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His
85 90 95

aac ctc acc ttc cac aag ctg gtg gcc tat atg atc tgc cta cat aca 336
Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr
100 105 110

gct att cac atc att gca cac ctg ttt aac ttt gac tgc tat agc aga 384
Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg
115 120 125

agc cga cag gcc aca gat ggc tcc ctt gcc tcc att ctc tcc agc cta 432
Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu
130 135 140

tct cat gat gag aaa aag ggg ggt tct tgg cta aat ccc atc cag tcc 480
Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser
145 150 155 160

cga aac acg aca gtg gag tat gtg aca ttc acc agc gtt gct ggt ctc 528
Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu
165 170 175

act gga gtg atc atg aca ata gcc ttg att ctc atg gta act tca gct 576

Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala

180

185

190

act gag ttc atc cgg agg agt tat ttt gaa gtc ttc tgg tat act cac

624

Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His

195

200

205

cac ctt ttt atc ttc tat atc ctt ggc tta ggg att cac ggc att ggt

672

His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly

210

215

220

gga att gtc cgg ggt caa aca gag gag agc atg aat gag agt cat cct

720

Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro

225

230

235

240

cgc aag tgt gca gag tct ttt gag atg tgg gat gat cgt gac tcc cac

768

Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His

245

250

255

tgt agg cgc cct aag ttt gaa ggg cat ccc cct gag tct tgg aag tgg

816

Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp

260

265

270

atc ctt gca ccg gtc att ctt tat atc tgt gaa agg atc ctc cgg ttt

864

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe

275

280

285

tac cgc tcc cag cag aag gtt gtg att acc aag gtt gtt atg cac cca

912

Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro

290	295	300	
tcc aaa gtt ttg gaa ttg cag atg aac aag cgt ggc ttc agc atg gaa			960
Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu			
305	310	315	320
gtg ggg cag tat atc ttt gtt aat tgc ccc tca atc tct ctc ctg gaa			1008
Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu			
325	330	335	
tgg cat cct ttt act ttg acc tct gct cca gag gaa gat ttc ttc tcc			1056
Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser			
340	345	350	
att cat atc cga gca gca ggg gac tgg aca gaa aat ctc ata agg gct			1104
Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala			
355	360	365	
ttc gaa caa caa tat tca cca att ccc agg att gaa gtg gat ggt ccc			1152
Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro			
370	375	380	
ttt ggc aca gcc agt gag gat gtt ttc cag tat gaa gtg gct gtg ctg			1200
Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu			
385	390	395	400
gtt gga gca gga att ggg gtc acc ccc ttt gct tct atc ttg aaa tcc			1248
Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser			
405	410	415	

atc tgg tac aaa ttc cag tgt gca gac cac aac ctc aaa aca aaa aag 1296

Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys

420

425

430

gtt ggt cat gca gca tta aac ttt gac aag gcc act gac atc gtg aca 1344

Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr

435

440

445

ggt ctg aaa cag aaa acc tcc ttt ggg aga cca atg tgg gac aat gag 1392

Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu

450

455

460

ttt tct aca ata gct acc tcc cac ccc aag tct gta gtg gga gtt ttc 1440

Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe

465

470

475

480

tta tgt ggc cct cgg act ttg gca aag agc ctg cgc aaa tgc tgt cac 1488

Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His

485

490

495

cga tat tcc agt ctg gat cct aga aag gtt caa ttc tac ttc aac aaa 1536

Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys

500

505

510

gaa aat ttt tga 1548

Glu Asn Phe

515

<210> 2

<211> 515

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val

1

5

10

15

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys

20

25

30

Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser

35

40

45

Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser

50

55

60

Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg

65

70

75

80

Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His

85

90

95

Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr
100 105 110

Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg
115 120 125

Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu
130 135 140

Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser
145 150 155 160

Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu
165 170 175

Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala
180 185 190

Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His
195 200 205

His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly

210

215

220

Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro

225

230

235

240

Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His

245

250

255

Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp

260

265

270

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe

275

280

285

Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro

290

295

300

Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu

305

310

315

320

Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu
325 330 335

Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser
340 345 350

Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala
355 360 365

Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro
370 375 380

Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu
385 390 395 400

Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser
405 410 415

Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys
420 425 430

Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr
435 440 445

Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
450 455 460

Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
465 470 475 480

Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
485 490 495

Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys
500 505 510

Glu Asn Phe
515

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaagggtcc aaaccacctc ttgacaat

28

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

aaaatgcaga ttaccgtcct tattccttaa

30

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

aaaacaaaaa aggttggtca tgcagca

27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tcaaaaattt tctttgttga a

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

attgcctctg aattcaaca

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

agtattgatg atcttaaa

18

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

ttgtaccttg tctactccca

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

acagagcaat gactccaaa

19

【0029】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

RA患者由来滑膜細胞におけるNOX1-b mRNAの発現上昇を示す図である。

【図 2】

NOX1-bのROS産生活性及びDPIによる阻害を示す図である。

【図 3】

NOX1-b発現細胞におけるCOX-2 mRNAの発現上昇とDPIによる阻害を示す図である

。

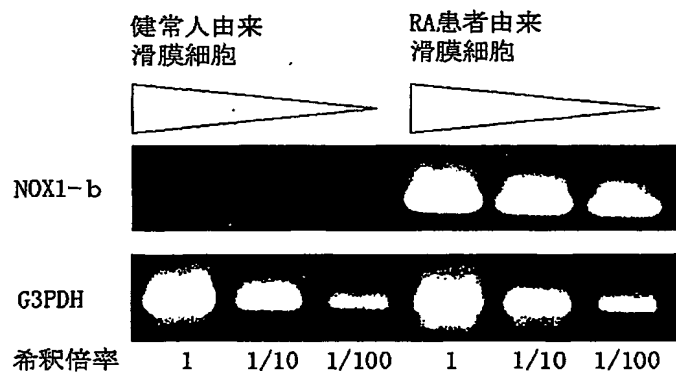
【図 4】

NOX1-b発現細胞におけるTNF- α mRNAの発現上昇とDPIによる阻害を示す図である

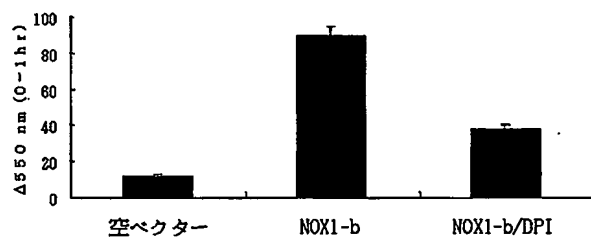
。

【書類名】 図面

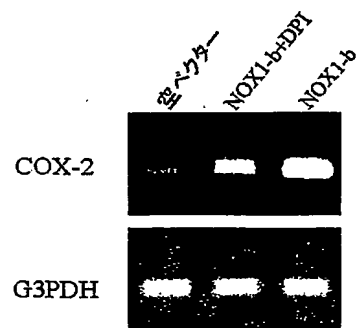
【図 1】



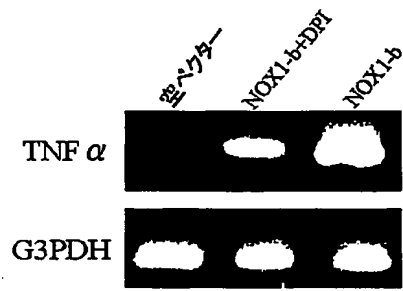
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明はROSを生成する酵素である新規なオキシダーゼを提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者は、ヒトRA患者由来滑膜細胞から新規なオキシダーゼ遺伝子全長配列を決定することに成功した。さらに該オキシダーゼ遺伝子は、健常人由来滑膜細胞には発現しておらず、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現していることを見出し、該オキシダーゼ特異的なプライマーを設計することによりRA診断法として有用な検査方法を可能にした。加えて、前記新規オキシダーゼ遺伝子を利用することによりRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法を構築し提供した。

特願 2003-060749

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社